



# Bättre sårhäkning hos kalvar som hålls med sin mamma?

– Sårhäkning och salivkortisol efter avhorning av mjölkkraskalvar med lång diperiod

---

*Better wound healing in calves held with their mother? – Wound healing and salivary cortisol after disbudding in dairy calves with long suckling period*

Rebecka Lindqvist

Självständigt arbete • 30 hp  
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Veterinärprogrammet  
Uppsala 2021





## Bättre sårhäkning hos kalvar som hålls med sin mamma? – Sårhäkning och salivkortisol efter avhorning av mjölkkraskalvar med lång diperiod

*Better wound healing in calves held with their mother? – Wound healing and salivary cortisol after disbudding in dairy calves with long suckling period*

Rebecka Lindqvist

**Handledare:** Hanna Eriksson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för  
husdjurens utfodring och vård

**Examinator:** Ove Wattle, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för kliniska  
vetenskaper

**Omfattning:** 30 hp

**Nivå och fördjupning:** A2E

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0869

**Program/utbildning:** Veterinärprogrammet

**Kursansvarig inst.:** Institutionen för kliniska vetenskaper

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2021

**Omslagsbild:** Rebecka Lindqvist

**Nyckelord:** avhorning, sårhäkning, salivkortisol, nötkreatur, inhysning, social grupp

**Sveriges lantbruksuniversitet**

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för husdjurens utfodring och vård

## Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här: <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

☒ JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

☐ NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

## Sammanfattning

Ett flertal studier indikerar på ett samband mellan social interaktion och snabbare sårhäkning hos olika djurslag. Social support kan även sänka kortisolnivåer i samband med en stressad situation. Fysisk kontakt mellan ko och kalv kan därför potentiellt bidra till bättre sårhäkning och lägre kortisolnivåer hos kalven efter avhorning.

Syftet med denna studie var att undersöka ifall sårhäkning och koncentration av salivkortisol efter avhorning skiljer sig mellan mjölkkraskalvar i grupp med respektive utan sina mammor. Försökskalvarna ( $n=16$ ) hölls med sina mammor i grupp med andra ko- och kalvpar, och kontrollkalvarna ( $n=16$ ) hölls i grupp med varandra. Kalvarna avhornades vid 14–20 dagars ålder och såren i respektive grupp mättes under de fyra nästkommande veckorna. Salivprover för analys av kortisol togs i försöksgruppen ( $n = 9$ ) respektive kontrollgruppen ( $n = 9$ ) vid fyra tidpunkter: 24 timmar före samt 4, 27 och 48 timmar efter avhorning.

Ingen statistisk skillnad mellan grupperna kunde fastslås avseende procentuell förändring i sårdiameter fyra veckor efter avhorning ( $p = 0,056$ ), men försökskalvarna hade en påfallande större sårreduktion än kontrollkalvarna. Inga statistiska skillnader förelåg mellan grupperna avseende salivkortisol vid 24 timmar före avhorning ( $p = 0,748$ ), inte heller 4 ( $p = 0,736$ ), 27 ( $p = 0,150$ ) eller 48 ( $p = 0,719$ ) timmar efter avhorning. Detta indikerar indirekt att den iögonfallande skillnaden i sårhäkning mellan grupperna inte berodde på skillnader i kortisolnivåer efter avhorning.

*Nyckelord:* avhorning, sårhäkning, salivkortisol, nötkreatur, inhysning, social grupp

## Abstract

Several studies indicate a relationship between social interaction and faster wound healing in different species. Social support can also have an inhibitory effect on cortisol levels in the context of a stressful situation. Physical contact between cow and calf can therefore potentially contribute to a better wound healing and lower cortisol levels in calves after disbudding.

The aim of this study was to investigate if wound healing and salivary cortisol levels after disbudding are different in dairy calves held in groups with or without their mothers. Test calves ( $n=16$ ) were held with their biological mothers in group with other cow-calf pairs, and control calves ( $n=16$ ) were held in group with each other. Disbudding was performed on calves aged 14–20 days and the wounds in each group were measured during the next four weeks. Saliva samples were collected for cortisol analysis at four different times: 24 hours before, followed by 4, 27 and 48 hours after disbudding.

No significant difference was found between the groups regarding percentual difference in wound diameter after four weeks ( $p = 0,056$ ), but the wounds in test calves had a notable greater reduction than wounds in control calves. No statistical differences were found between groups regarding salivary cortisol at 24 hours before ( $p = 0,748$ ), neither 4 ( $p = 0,736$ ), 27 ( $p = 0,150$ ) or 48 hours ( $p = 0,719$ ) after disbudding. These results indirectly indicate that the notable difference in wound healing between the groups was not due to differences in cortisol levels after dehorning.

*Keywords:* disbudding, wound healing, salivary cortisol, cattle, housing, social group



# Innehållsförteckning

<b>1. Inledning.....</b>	<b>9</b>
<b>2. Litteraturoversikt .....</b>	<b>10</b>
2.1. Den sociala gruppens effekt på sår läkning .....	10
2.1.1. Grupphållning av ko och kalv – potentiell inverkan på sår läkning .....	10
2.2. Avhorning.....	11
2.2.1. Brännsår .....	12
2.3. Sår och sår läkning .....	12
2.3.1. Generella sår läkningsprinciper .....	12
2.4. Kortisol, smärta och stress .....	13
2.4.1. Kortistolfrisättning .....	13
2.4.2. Smärtmekanismer vid brännskada .....	14
2.4.3. Cirkulerande kortisolnivåer efter avhorning med brännjärn.....	14
2.4.4. Glukokortikoiders potentiella effekt på sår läkning .....	15
2.4.5. Salivkortisol hos nötkreatur.....	15
2.5. Sociala faktorerers inverkan på kortisol.....	16
<b>3. Material och metoder .....</b>	<b>18</b>
3.1. Djur och urval .....	18
3.1.1. Grupper .....	18
3.1.2. Inhysning och skötselrutiner .....	19
3.2. Avhorning.....	21
3.2.1. Öronmärkning, kastrering och extraspenar .....	22
3.3. Observationer .....	23
3.3.1. Sår läkning .....	23
3.3.2. Salivkortisol.....	23
3.4. Databehandling .....	24
3.4.1. Sår läkning .....	24
3.5. Statistiska metoder .....	24
3.5.1. Sår läkning .....	24
3.5.2. Salivkortisol.....	24
<b>4. Resultat.....</b>	<b>25</b>
4.1. Sår läkning.....	25

4.1.1.	Deskriptiva resultat .....	25
4.1.2.	Hypotestestning .....	27
4.2.	Salivkortisol .....	28
4.2.1.	Deskriptiva resultat .....	28
4.2.2.	Hypotestestning .....	29
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>30</b>
5.1.	Sårläkning.....	30
5.2.	Salivkortisol .....	32
5.3.	Potentiella faktorerers påverkan på sårläkningen .....	34
5.4.	Slutsatser.....	36
	<b>Referenser.....</b>	<b>37</b>
	<b>Populärvetenskaplig sammanfattning .....</b>	<b>41</b>
	<b>Bilagor .....</b>	<b>43</b>
	Bilaga 1 .....	43
	Bilaga 2 .....	44



# 1. Inledning

Nötkreatur är ett socialt djurslag som i vilt tillstånd, eller i extensiv drift, lever i flockar om 10–15 närbesläktade individer och deras kalvar. De har ett sofistikerat kommunikationsbeteende och kan utveckla starka sociala band (Nilsson 2019). I moderna inhysningssystem separeras ofta kalvarna från kon under det första dygnet och hålls därefter i ensamboxar under en period innan de får växa upp i grupp i samvaro med kalvar med liknande ålder.

Hos andra grupplevande djurslag har social isolering visat sig påverka sår läkning negativt (Detillion *et al.* 2004; Glasper & DeVries 2005; Pyter *et al.* 2014). I ett examensarbete, där sår läkning observerades under fyra veckor efter avhorning hos kalvar som hölls isolerade i ensamboxar och hos kalvar som hölls i social grupp tillsammans med sina mammor, sågs tecken på att detta även kan vara fallet hos mjölkraskalvar (Molin Björkdahl 2020). Det vore av intresse att ta reda på ifall dessa skillnader föreligger även under inhysningsförhållanden där kalvar hålls i social grupp och då med respektive utan sina mammor.

Efter avhorning ses generellt höga kortisolnivåer efter att den postoperativa smärtlindringen har avklingat, vilket genom beteendestudier har tolkats som en fysiologisk smärt- och stressreaktion på ingreppet. Även hos andra djurslag finns resultat som indikerar att kortisol kan påverka sår läkning negativt (Stephens *et al.* 1971; Detillion *et al.* 2004). Social samvaro tillsammans med andra individer har visat sig kunna sänka kortisolresponsen vid en stressande situation hos människor såväl som nötkreatur och andra djurslag (Munksgaard & Simonsen 1996; Detillion *et al.* 2004; Ditzen *et al.* 2007). Frågan återstår dock om huruvida denna kortisolkämmade effekt är högre hos kalvar som hålls i grupp med sin mamma.

Syftet med denna studie var att undersöka om det föreligger skillnader i sår läkning och salivkortisolnivåer efter avhorning, mellan kalvar som hålls i social grupp med respektive utan sina mammor.

## 2. Litteraturöversikt

### 2.1. Den sociala gruppens effekt på sårhäkning

Gouin & Kiecolt-Glaser (2011) påvisade att sårhäkningen av kirurgiskt tillfogade sår, under de första 24 timmarna efter sårens tillfogande, var långsammare hos markar med äktenskapliga konflikter än hos par som uppvisade social support.

Det finns hos flera djurslag indikationer på att social samvaro är gynnsamt för sårhäkning, även om det framför allt är gnagare som studerats (Detillion *et al.* 2004; Glasper & DeVries 2005; Pyter *et al.* 2014). Glasper & DeVries (2005) fann att sårhäkningen faciliterades av social kontakt hos monogama musarter, men däremot inte hos arter som naturligt uppvisar polygyni.

Det finns inte många studier, av hur sårhäkning hos nötkreatur påverkas av social samvaro, att finna i vetenskapliga databaser. Preliminära resultat indikerar dock på att sårhäkningen går snabbare hos kalvar som hålls tillsammans med sin mamma (Molin Björkdahl 2020). Där sågs att reduktionen av sårdiametern hos kalvarna i ko-kalvgruppen var större än hos isolerade kalvar fyra veckor efter avhorning. Den sociala gruppens effekt, det vill säga att kalvarna även hölls tillsammans med andra individer inte enbart deras mamma, kunde inte utvärderas. Orsakerna bakom den snabbare sårhäkningen undersöktes inte heller, men i diskussionen nämndes högre oxytocin-nivåer, lägre kortisolnivåer och slickande av såren som potentiellt bidragande faktorer.

#### 2.1.1. Grupphållning av ko och kalv – potentiell inverkan på sårhäkning

Råmjölk innehåller essentiella tillväxtfaktorer som TGF alfa och beta samt IGF 1- och 2 som initierar sårhäkning (Uruakpa *et al.* 2002). Att hålla ko och kalv tillsammans kan potentiellt medföra ett bättre råmjölksintag ifall kalven får dia vid födseln, vilket i sin tur troligen kan påverka sårhäkning positivt. Stott *et al.* (1979) observerade att det tidiga upptaget och även det maximala upptaget av råmjölk var

högre hos kalvar som fick i sig råmjölk via digivning än hos kalvar som blev matade råmjölk via nappflaska.

Näringsstatus är också en viktig förutsättning för normal sårhäkning. På människa har man sett att undernäring hämmar sårhäkning, ökar risken för infektioner och minskar sårshållfasthet (Stechmiller 2010). Förlängd dioperiod för mjölkkalvar har gett en ökad tillväxt hos kalvarna (Metz 1987; Flower et Weary 2001), vilket delvis ansågs kunna förklaras av att kalvarna fick i sig mer mjölk vid digivningen än de som utfodrades med mjölkhink. Detta kan innebära att kalvar som får dia får ett näringsmässigt försprång och potentiellt snabbare sårhäkning än kalvar som har begränsad mjölkgeva. Metz (1987) framhåller dock att en minskad sjukdomsincidens hos kalvar som hålls med sin mamma även kan bidra till en ökad tillväxt.

## 2.2. Avhorning

Avhorning av kalvar görs bland annat med avseende på den långsiktiga djurvälståndet, då djur riskerar att skada andra djur i besättningen med hornen (Växa Sverige 2020). Ingreppet kan dock vara både stressande och smärtsamt för kalvarna (Heinrich *et al.* 2009; Morisse *et al.* 1995; Wohlt *et al.* 1994). När finska lantbrukares inställning till avhorning undersöktes uppgav många lantbrukare att de tog smärteupplevelsen efter avhorning hos kalvar på allvar (Wikman *et al.* 2013). Känsligheten för djurens upplevda smärta var högre hos kvinnliga lantbrukare än manliga, och dessa var även mer benägna att vara positivt inställda till att smärtlindra kalvarna i samband med avhorning.

I Sverige avhornas kalvar traditionellt med brännjärn, som värms upp elektroniskt eller med hjälp av en gaslåga. Enligt svensk lagstiftning ska ingreppet utföras av veterinär, annan djurhälsopersonal eller annan person som veterinär finner lämplig (SFS 2019:66). Vanligtvis skärs först toppen av hornanlaget av med en skalpell, och därefter placeras brännjärnet dikt an mot resterande hornanlag och hålls kvar mellan 10–15 sekunder. Om hornanlagets storlek överskrider brännjärnets diameter kan en s.k. ”blomma” utföras där flera brännmärken överlappar varandra i en blomliknande formation för att säkerställa att hela hornanlaget blir bränt (Molin Björkdahl 2020). Vid korrekt utförd avhorning med brännjärn uppstår en brännskada i samtliga lager av epidermis och dermis vilket förhindrar fortsatt tillväxt av hornet (Stilwell *et al.* 2012).

I Sverige används vanligen lokalanestetikan lidokain, som injiceras subkutant vid crista temporalis för blockering av nervus cornuale, vid avhorning. Lokalbedövning vid avhorning minskar effektivt den initiala smärtresponsen direkt i samband med ingreppet (Faulkner & Weary 2000) men då bedövningen avtar efter några timmar

(Graf & Senn 1999) eller ännu tidigare än så (Doherty *et al.* 2007) är effekten av denna inte tillräckligt för att lindra den postoperativa smärtan från brännskadan. För att erhålla en mer långvarig smärtlindring administreras ofta NSAID i form av meloxicam eller karprofen i samband med ingreppet. Meloxicam har en halveringstid på 26 timmar hos yngre nötkreatur (FASS Djurläkemedel 2020).

### 2.2.1. Brännsår

Enligt Rowan *et al.* (2015) kan ett brännsår delas in i tre zoner, baserat på graden av vävnadsskada och förändringar i blodflödet. Den centrala delen av såret är den som utsätts för mest värme, och då de lokala proteinerna börjar denaturera ses i detta område en utbredd cellnekros. I den omgivande zonen påverkas cellerna av den ischemi som uppstår då blodkärl bränns av, och enligt en studie av Singer *et al.* (2008) sker nekros samt, i mindre omfattning, apoptos hos celler i detta område under flera dagar efter den initiala skadan. Den yttersta zonen består av ett hypere-miskt område med ökat blodflöde på grund av vasodilatation medierat av den inflammatoriska reaktionen (Rowan *et al.* 2015). Brännsår ger även upphov till ödem i den omkringliggande vävnaden (Junger *et al.* 2002).

## 2.3. Sår och sårhäkning

### 2.3.1. Generella sårhåkningsprinciper

Normal sårhäkning delas generellt in i tre överlappande faser: inflammationsfas, nybildningsfas och mognadsfas (Singer & Clark 1999; Li *et al.* 2007). För att ytterligare vidga begreppet kan även blodproppsfas (i samband med inflammationsfas), granulationsfas, neovaskularisering och re-epitelisering (under nybildningsfas) användas som underkategorier (Rousselle *et al.* 2019).

Inledningsvis under brännskadans inflammationsfas utsöndrar de skadade parenkymalcellerna kemotaktiska substanser samt vasoaktiva mediatorer. Dessa attraherar i sin tur inflammatoriska celler, främst makrofager och neutrofiler, till det skadade området, vilka debriderar sårområdet (Singer & Clark 1999). Makrofager frisätter även tillväxtfaktorer som attraherar keratinocyter (epidermalceller), fibroblaster och celler för nybildning av blodkärl (Rousselle *et al.* 2019).

Nybildningsfasen påbörjas redan timmar efter den initiala skadan med målet att återställa dermis och epidermis över sårområdet. Under denna period genomgår epidermala celler en fenotypisk förändring och intercellulära bindningar löses upp vilket möjliggör att cellerna kan migrera över sårområdet. Epidermala celler (keratinocyter) producerar även enzymer som bryter ned gammalt extracellulär matrix

(ECM), och nya epidermalceller börjar proliferera i sårkanterna (Singer & Clark 1999). Re-epiteliseringen stimuleras av epidermala och transformerande tillväxtfaktorer, producerade av bland annat makrofager och keratinocyterna själva. Efter ungefär tre till fem dagar påbörjas även nyformationen av granulationsvävnad i såret, då blodkärl växer in i såret och fibroblaster ackumuleras vilka frisätter nytt ECM i sårhålan, till stor del bestående av kollagen (Rousselle *et al.* 2019). Fibroblasterna differentierar även till myofibroblaster, och potentiellt även andra fenotyper, som stimulerar sårkontraktionen vilken uppnår full effekt inom två veckor efter skadans uppkomst. Kontraktionseffekten är av stor betydelse för läkningen och kan stå för 40 % av minskad sårstorlek (Li *et al.* 2007) - i en studie estimerades kontraktionen stå för hela 90 % (Stephens *et al.* 1971).

Den sista fasen, mognadsfasen, kan fortgå mer än ett år men är egentligen en pågående fas under hela läkningsprocessen och karaktäriseras av deponering av nytt ECM. Detta består av olika typer av kollagen, proteiner som utgör grunden till strukturen, styrkan och stelheten i huden. Sammansättningen av de olika typerna kollagen förändras över tid under den sista delen av läkningsprocessen (Li *et al.* 2007)

## 2.4. Kortisol, smärta och stress

### 2.4.1. Kortistofrisättning

Frisättningen av glukokortikoider sker via hypothalamus-hypofys-binjureaxeln (HPA-axeln). Detta genom att kortikotropin (CRH) frisätts från hypothalamus, vilket i sin tur binder till hypofysen som frisätter adenokortikotropiskt hormon (ACTH). Binjurebarken stimuleras av ACTH och frisätter då glukokortikoider, inklusive kortisol, vilka i sin tur ger en negativ feedback på hypothalamus och hämmar frisättningen av CRH (Allen & Sharma 2020). HPA-axelns aktivitet styrs direkt och indirekt från signaler från framhjärnan och hjärnstammen. Stimulering av axeln sker vid stressande upplevelser, men även vid exempelvis träning, sexuella aktiviteter samt av ångstdämpande läkemedel (Spencer & Deak 2017).

Hos människor ses en distinkt cirkadisk rytm i frisättningen av kortisol under dygnet (Chan & Debono 2010). Vad gäller nötkreatur ses inte samma mönster (Lefcourt *et al.* 1993; Ladewig & Smidt 1989). Thun *et al.* (1981) noterade dock ett mönster där högst nivåer observerades under morgonen och lägst under kvällstid. En cirkadisk eller diurnal rytm hos nötkreatur kan alltså tänkas existera, men eventuellt ha en svagare karaktär än hos människor.

### 2.4.2. Smärtmekanismer vid brännskada

Smärtmekanismerna vid en brännskada består främst av stimulering av nociceptorerna i den skadade huden samt hyperalgesi till följd av det inflammatoriska svaret efter skadan (Latarjet & Choinère 1995). Smärtsignaleringen sker genom att den akuta inflammationen producerar kemiska substanser som aktiverar nociceptorer. Ett flertal av dessa substanser, såsom cytokiner, histaminer och prostaglandiner, agerar i grupp och kan tillsammans sänka tröskeln för signalering hos vissa nociceptorer. Substanserna kan även aktivera sovande nociceptorer runtomkring det skadade området. Tillsammans leder denna receptorstimulering till hypersensitisering och hyperalgesi i omkringliggande vävnad (Anderson & Muir 2005). Sensitiseringsen av det närliggande hudområdet ökar successivt över flera timmar efter skadans uppkomst, eller potentiellt längre än så (Junger *et al.* 2002).

### 2.4.3. Cirkulerande kortisolnivåer efter avhorning med brännjärn

En ökning av kortisolnivåerna som ett svar på stress och smärta hos kalvar efter avhorning med brännjärn är sedan länge befast (Morisse *et al.* 1995; Graf & Senn 1999; Stilwell *et al.* 2012). Kortisolnivån kan naturligtvis stiga av enbart stressen från hantering och fasthållning av kalvarna, men nivåerna stiger mer då kalvar avhornas med varmt brännjärn jämförts med skenavhorning (Stilwell *et al.* 2012). Även Graf & Senn (1999) uppmätte beteendeskilnader upp till 3 timmar postoperativt och högre kortisolstegring hos icke-lokalbedövade avhornade kalvar jämfört med skenavhornade. Likaså visade Wohlt *et al.* (1994) kortisolstegring hos avhornade jämfört med skenavhornade kalvar.

När kortisolstegringen inträffar efter avhorningen beror på valt anestesi-protokoll. Lokalbedövning ger en kortvarig men betydande smärtlindring upp till två timmar postoperativt (Graf & Senn 1999; Doherty *et al.* 2007) – följaktligen ses ofta en ökning av kortisolnivåerna några timmar efter avhorning med lokalbedövning (Morisse *et al.* 1995; Stilwell *et al.* 2012). Då meloxicam (NSAID) använts tillsammans med lokalbedövning sågs en minskad ökning i kortisolnivåerna i upp till sex timmar postoperativt (Heinrich *et al.* 2009). En effekt som även setts vid användandet av karprofen (Stilwell *et al.* 2012). Kortisolnivåerna var dock ökade hos dessa kalvar 24 timmar postoperativt, i båda dessa studier, vilket kan berott på att smärtan fördröjts av de antiinflammatoriska läkemedlen.

#### 2.4.4. Glukokortikoiders potentiella effekt på sårhäkning

Kortisol och kortison, ett inaktivt förstadium till cortisol, kan ha en hämmande effekt på sårhäkningen. Detillion *et al.* (2004) utförde ett försök där läkning av kirurgiskt tillfogade sår hos hamstrar med bortopererade binjuror jämfördes med icke-opererade hamstrar. Adrenalektomin innebär en inhibering av den endogena cortisolfrisättningen. Man observerade att såren hos hamstrarna utan binjuror och som utsatts för stress var signifikant mindre än hos icke-opererade kontrollgruppen upp till fyra dagar efter sårens uppkomst. Författarna konkluderade att stress-inducerad cortisolsekretion inhiberade sårhäkningen via HPA-axeln.

Stephens *et al.* (1971) behandlade kaniner i två försöksgrupper. Till den ena gruppen gavs injektioner av kortison antingen direkt i samband med att hudskador tillfogades på fyra ställen på kroppen, och till den andra fem dagar efter skadorna och därefter dagligen i lägre dos till dag 25. En kontrollgrupp utan kortisoninjektioner tillfogades också sår. Sårhäkningen hos kaninerna som erhållit kortisoninjektioner var fördröjd, framförallt när kortison injicerats fem dagar efter sårens uppkomst. Slutsatsen drog att kortison och antagligen andra antiinflammatoriska steroider hämmat sårkontraktionen både initialt i läkningsprocessen samt när det inflammatoriska svaret redan satt in.

Det finns dock visst belegg för att kortisols roll i sårhäkningsprocessen inte är helt klarlagd. När sårhäkning i förhållande till social status undersöktes (Archie *et al.* 2012) fann man att hannar med högst social status, alfahannar, hade bäst sårhäkning trots att dessa visat sig ha höga glukokortikoid- samt testosteronnivåer (Gesquiere *et al.* 2011). Detta kan innebära att det finns en flexibilitet i kortisols immunhämmande effekt som är avhängig av faktorer som förknippas med låg social rang, såsom ålder, kronisk stress och dålig fysisk hälsa (Archie *et al.* 2012). Då kortisolvivåerna inte uppmättes hos djuren finns dock ett visst mått av osäkerhet i denna teori.

#### 2.4.5. Salivcortisol hos nötkreatur

Salivcortisol hos nötkreatur korrelerar väl med djurets plasmakortisol. Perez *et al.* (2004) validerade en enzyme immunoassay (EIA) för salivcortisol hos nötkreatur, och kunde visa ett starkt positivt samband mellan kortisolnivåerna i blod och saliv, både för vuxna (>1 år) och unga djur (<1 år).

Negrão *et al.* (2004) utförde två försök där både blodplasma- och salivcortisol mättes efter att ha injicerat ACTH hos kalvar samt efter maskinmjölkning av vuxna kor. Man såg ett signifikant och positivt samband mellan plasma- och salivcortisolnivåerna i båda experimenten, med den skillnaden att koncentrationen av cortisol

var betydligt högre i blodproverna. Den förklaring som gavs var att blodproverna fångade upp både den totala kortisolnivån (den proteinbundna samt den fria, biologiskt aktiva fraktionen) medan salivkortisolet endast speglade den fria fraktionen av kortisol i blodet. Schwinn *et al.* (2016) diskuterade att den låga koncentrationen troligen beror på plasmakortisol konverteras till kortison i spottkörtlarna. Ett positivt samband mellan skillnader i plasma- och salivkoncentrationer visades också av Hernandez *et al.* (2014). Stegning av kortisol i plasma följdes av stegring av salivkortisol, med 10 minuters fördröjning.

Schwinn *et al.* (2016) observerade ett positivt samband mellan blod- och salivkortisol efter ACTH-stimulering hos vuxna kor. Korna fick i en kompletterande del av studien äta eller dricka i samband med salivprovtagning. Resultaten visade att födo- eller vattenintag inte hade någon effekt på salivkortisolet, och endast en mycket svag korrelation förelåg avseende blodkortisol. Man observerade dock individuella kor hade effekt på både saliv- och blodkortisolresultaten.

## 2.5. Sociala faktorerers inverkan på kortisol

Flera faktorer samverkar troligen vad gäller kortisolnivåerna i olika sociala sammanhang. I humana studier har man bland annat sett att fysisk beröring av en partner innan en stressad situation minskar kortisolverkningen hos kvinnor (Ditzen *et al.* 2007), ett fynd som även observerats hos män efter verbal support från partnern (Ditzen *et al.* 2008). Hud mot hud-kontakt mellan moder och nyfödda barn har påvisats öka oxytocinnivåerna och sänka kortisolnivåerna hos barnen (Vittner *et al.* 2018).

Den sociala effekten på kortisol är välstuderat på flera djurslag. Detillion *et al.* (2004) observerade markant lägre kortisolnivåer efter ett stressmoment hos hamstrar som hölls i grupp jämfört med isolerade hamstrar. Slutsatsen blev att en social samvaro kan hämma den akuta stressaktiveringen av HPA-axeln och därmed sänka kortisolfrisättningen i samband med stressade situationer. Liknande resultat sågs hos nötkreatur som hölls isolerade i 22 dagar (Munksgaard & Simonsen 1996). Även hos får har ökade kortisolnivåer observerats vid isolering i tre dagar jämfört med gruppållning, detta utan djuren exponerades för ytterligare stressmoment (Moolchandani *et al.* 2008).

Gällande kalvar finns inte lika många studier publicerade som utvärderat den sociala miljöns påverkan på cirkulerande kortisolnivå. Lupoli *et al.* (2001) mätte effekterna av diande från mamman hos kalvar och observerade att dikalvar hade en signifikant lägre kortisolnivå efter 30 minuter än kalvar som istället fick dricka mjölk ur en napphink. I samband med detta uppmättes även höga nivåer av oxytocin hos



diande kalvar, vilket författarna tror är en bidragande faktor till de lägre kortisolnivåerna då detta hormon sänker stressnivån hos kalvarna.

Det finns inga internationellt publicerade studier som uppmätt kortisolnivåer efter avhorning hos kalvar som hålls tillsammans med sina mammor och jämfört dessa med kalvar som hålls i grupp med jämngamla kalvar. Att ko-kalvhållningen har effekt vid isolering redovisas däremot av Wagner *et al.* (2015), som påvisade högre kortisolnivåer vid isolering hos gruppållna kalvar jämfört med kalvar som fick vistas med sin mamma upp till ca 4,5 månaders ålder.

## 3. Material och metoder

### 3.1. Djur och urval

Försöket utfördes hösten 2020 på Lövsta lantbruksforsknings försöksgård inom projektet Ko och Kalv tillsammans i automatisk mjölkproduktion under etiskt tillstånd med diarienummer 5.8.18-0678/2020. Mjölkraskalvar av rasen svensk röd och vit boskap, SRB (n = 25), och svensk holstein, SH (n = 15), födda mellan 01.09.2020 och 15.10.2020 delades in i en försöks- respektive kontrollgrupp. Indelningen skedde genom att varannan kvigkalv delades in i försöksgruppen och varannan i kontrollgruppen, samma urval skedde för tjurkalvar. Analys av totalprotein i serum gjordes hos samtliga kalvar, mellan två och sju dagar efter födseln. Kalvar vars totalprotein i serum understeg 5g/dL exkluderades ur studien för att otillfredsställande immunitet inte skulle påverka resultatet.

#### 3.1.1. Grupper

Grupperna bestod initialt av 21 kalvar i försöksgruppen och 19 i kontrollgruppen. Några kalvar ur försöksgruppen (n = 2) samt kontrollgruppen (n = 3) exkluderades på grund av låga totalproteinnivåer. Två kalvar utgick ur försöksgruppen på grund av sjukdom eller trauma. Ytterligare en kalv ur försöksgruppen utgick ur försöket innan avhorning då mamman till denna avlivades på grund av sjukdom. Totalt 16 kalvar i försöksgruppen och 16 i kontrollgruppen ingick under hela observationsperioden (Tabell 1).

Tabell 1. Sammanställning av försöks- respektive kontrollgrupper avseende ras, kön samt antal exkluderade och utgående djur.

	Försöksgrupp (antal kalvar)	Kontrollgrupp (antal kalvar)
SRB	13	12
SH	8	7
Kvigkalvar	14	12
Tjurkalvar	7	7
Utgick p.g.a. S-TP* <5g/dL	2	3
Utgick p.g.a. annan orsak**	3	0

\*Totalprotein i serum. \*\*Utgick innan fjärde veckans sårmetning.

### 3.1.2. Inhysning och skötselrutiner

Kort efter födseln gavs hälften av kalvarna i försöksgruppen (n = 9) 2,5–3 liter råmjölk ur nappflaska och den andra hälften (n = 8) fick själva dricka råmjölk från kon. En av kalvarna som gavs råmjölk ur flaska drack endast 1 liter mjölk, men diade även själv från kon. Kalvarna i kontrollgruppen gavs 2,5–3 liter råmjölk ur nappflaska. Kvaliteten på råmjölken kontrollerades avseende immunoglobuliner med BRIX-mätare. Vid sammanlagt sju tillfällen hade råmjölken från kalvens moder ett BRIX-värde <22 %, då gavs istället upptinad råmjölk av god kvalitet som förvarats fryst. Hälsokontroll av samtliga kalvar utfördes i respektive grupp två gånger i veckan i samband med ett annat examensarbete inom projektet.

Kalvar i försöksgruppen fick stanna med sin mamma i kalvningsboxen fram till sjätte mjölkningen för att paret skulle hinna bilda en stark relation. Därefter förflyttades paret till ett inomhusbaserat lösdriftssystem (DeLaval Voluntary Milking System, VMS), bestående av två rader spånbeströdda liggbås som separerades i mitten av en gödselgång med automatisk gödselskrapa (Figur 1). I VMS hade försöks-

kalvarna tillgång till sina mammor under hela tiden i det för kor och kalvar gemensamma utrymmet, utom när korna valde att gå till mjölkningsroboten för att mjölkas eller grovfoderavdelningen för att äta. Försökskalvarna hade utöver det gemensamma utrymmet även tillgång till en s.k. kalvgömma till vilken inte korna hade tillgång (Figur 2). Kalvgömmen bestod av en rikligt spånbeströdd korridor samt några liggbås där kalvarna kunde vila. Försökskor- och kalvar hade fri tillgång till vatten och grovfoder dygnet runt, och kalvarna hade även fri tillgång till kraftfoder i kalvgömmen.



*Figur 1. Försökskalvar- och kor i det gemensamma utrymmet i VMS. Kalvgömmen lokaliserad parallellt med den högra raden av liggbås, mjölkningsområdet parallellt med den vänstra raden.*



*Figur 2. Försökskalvar i kalvgömmen.*

Kalvar i kontrollgruppen separerades från kon inom några timmar efter födseln och flyttades initialt till ensamboxar i två till åtta dagar (Bilaga 2, Figur 9). Därefter flyttades de till en av fyra gruppboxar med andra kontrollkalvar. Ingen kontrollkalv hölls vid något tillfälle ensam i gruppboxarna, omplacering till tom gruppbox skedde först när minst två kontrollkalvar var gamla nog. Gruppboxarna var rikligt spånbeströdda på den större delen av ytan, och hade spaltgolv på en mindre del av den främre långsidan (Figur 3). Kontrollkalvarna hade fri tillgång till vattennipplar,

kraft- och grovfoder i boxarna och erbjöds tre liter mjölk ur mjölkhink med napp vid tre tillfällen per dygn (initialt kl. 07, 12 och 18, lunchfodringen ändrades till kl. 13 efter att första kalven avhornats). Kontrollkalvarna kunde varken se eller höra sina mammor i sina gruppboxar.



*Figur 3. Kontrollkalvar i en av gruppboxarna. Ytterligare en gruppbox är lokaliserad till höger om boxen.*

### 3.2. Avhorning

Kalvarna vägdes dagen före avhorning för att beräkna läkemedelsdoser. Avhorning utfördes vid 7 tillfällen mellan 15.09.2020 och 28.10.2020 när kalvarna var i åldern 14–20 dagar. Ingreppet påbörjades vid samma tid varje gång (kl. 11) för att eliminera eventuell diurnal kortisolvariation, och startade alltid hos kontrollgruppen för att inte dra in patogener från vuxna djur till kontrollkalvarna. Vid avhorning anlitas veterinär från Ambulatoriska kliniken i Uppsala, och samma veterinär utförde samtliga avhorningar. Studenter från Sveriges lantbruksuniversitet eller annan försökspersonal assisterade med tidtagning för varje moment.

Kalvarna sederades intramuskulärt med xylazin (Rompun® Vet, 20 mg/ml, Elanco Denmark) 1,5 ml/100 kg. Efter 10 minuter administrerades lokalbedövning under crista temporalis för blockering av n. cornuale genom en subkutan kvaddel av lidokain + adrenalin (Lidokel-Adrenalin Vet, 20 mg/ml + 0,036 mg/ml, Kela Laboratoria) 3 ml/injektionsställe. Tjurkalvar lokalbedövades även intratestikulärt samt subkutant i tänkt snittlinje för scrotum med 10–15 ml lidokain (Lidor Vet, 20 mg/ml, Salfarm Scandinavia). I samband med lokalbedövning injicerades också meloxicam (Metacam®, 20 mg/ml, Boehringer Ingelheim Animal Health) 2,5 ml/100 kg subkutant i halsområdet. Ett ca 4x4 cm stort område runt hornanlagen maskinklipptes. Kvigkalvar med extraspenar fick dessa borttagna med steril sax (n

= 3 i försöksgrupp, n = 2 i kontrollgrupp). Ytterligare 10 minuter efter lokalbedövning påbörjades ingreppet genom att respektive hornanlag skars av med ett skalpellblad, därefter placerades brännjärnet dikt an, vinkelrätt mot resterande hornanlag. Enligt protokollet skulle järnet hållas på plats under 10–15 sekunder tills en torr brännyta och en tydligt markerad, ljus ring runt hela hornanlaget kunde observeras. Bränntiden hos kalvarna varierade i praktiken mellan 10–21 sekunder per hornanlag (Figur 4), då temperaturen på brännjärnet varierade något och inte alltid uppnådde fullgod bränneffekt vid 15 sekunder. På grund av att hornanlagets storlek överskred brännjärnets yta brändes hos en kalv i kontrollgruppen en s.k. ”blomma” genom 15 sekunders bränning av en centrerad ring samt fyra överlappande ringar runtom denna á 3 sekunder.

Hos försökskalvarna skedde avhorningen i kalvgömman eller i något av de för ko och kalv gemensamma liggbåsen. Kalven fick själv förflytta sig fritt mellan kalvgömma och gemensamma utrymmen så fort sederingen avtagit. Hos kontrollkalvarna skedde avhorningarna i gruppboxarna.

### 3.2.1. Öronmärkning, kastrering och extraspenar

Kalvarna försågs direkt efter födseln med en aktivitetsmätare i form av en försöksbricka i vänster öra. Av utrymmesskäl behövde då ID-öronmärkning i detta öra ske när kalvarna blivit lite större. Öronmärkning ska dock ske inom 20 dagar efter födsel enligt Jordbruksverkets föreskrifter, därför märktes samtliga kalvar med ID-bricka i vänster öra i samband med avhorning medan sederingen fortfarande hade effekt.

Tjurkalvarna kastrerades efter avhorningen, förutom en kalv som hade diarré vid avhorningen och istället kastrerades vid ett senare tillfälle. Kastreringarna påbörjades inom fem minuter efter avslutad avhorning. Ingreppet utfördes genom att scrotum steriliserades med 70 % spritlösning eller jodlösning, därefter klipptes nedre tredjedelen av scrotum med steril sax och testiklarna blottades. En maschtång anlades över båda funiklar och fick sitta i fem minuter innan funiklarna klipptes av. Därefter lossades tången och hemostaskontroll utfördes.

Eventuella extraspenar hos kvigkalvar avlägsnades under sedering efter avhorningen, utan lokalbedövning, med en steril sax. I försöksgruppen hade tre kalvar 1–3 extraspenar, i kontrollgruppen hade två kalvar 1–2 extraspenar.

### 3.3. Observationer

#### 3.3.1. Sårläggning

Såren efter avhorning mättes med ett elektroniskt skjutmått, vid sårens bredaste diameter, direkt efter avhorning och därefter var sjunde dag under fyra veckors tid. Sårläggningen studerades därmed inte tills såren var helt utläkta. En och samma person utförde samtliga mätningar i respektive grupp.

#### 3.3.2. Salivkortisol

Provtagning gick till som följer: en bomullspinne (Salivette® Cortisol, code blue, SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Tyskland) fördes in i munnen med en ren peang och hölls kvar i 2–5 minuter tills pinnen var indränkt i saliv, och placerades sedan i den medföljande plasthysan. Provet kontrollerades visuellt efter spår av blod, vilket inte observerades vid något tillfälle. Direkt efter provtagning placerades proverna i isbad, och centrifugerades inom 60 minuter i 1000 x g i 2 minuter. Proverna förvarades fryst i -20°C i väntan på analys, vilket utfördes inom två månader efter första provtagning. Kompetitiv ELISA-analys av salivkortisol (Salivary Cortisol ELISA Kit, Salimetrics, Carlsbad, CA, USA) utfördes av KV-lab på Sveriges Lantbruksuniversitet. Den detekterbara gränsen för analysmetoden var 0,028 µg/dL. De flesta prover hade ett interassay CV mellan  $1,14 \times 10^{-6} \%$  – 12,66 %. Enstaka prov hade upp till 21,49% vilket troligen berodde på låga koncentrationer av kortisol i dessa prover.

Salivkortisol analyserades på de första sex kvigkalvarna samt de första tre tjurkalvarna i respektive grupp. Fördelningen av kvig- och tjurkalvar hos de utvalda djuren motsvarade ungefär den totala könsfördelningen hos kalvar i försöksgruppen (41,2 %) respektive kontrollgruppen (37,5 %). Åldersmässigt skiljde det maximalt sju dagar mellan kalvarna.

Saliv samlades in 24 timmar före avhorning för att få ett nollvärde, samt 4, 27 och 48 timmar efter avhorning för varje kalv som valts ut för provtagning. Den första avhornade kalven provtogs andra gången vid 26 timmar efter avhorning, vilket var den från början planerade tidpunkten baserat på halveringstiden för meloxicam på nötkreatur. Övriga kalvar provtogs vid 27 timmar efter avhorning, då mjölkutfodringstiden behövde ändras för kontrollkalvarna av praktiska anledningar. En kalv i försöksgruppen noterades dia precis innan 27-timmarsprovtagningen, på vilken provet istället togs en timme senare. Provtagningarna utfördes av en eller två tränade personer som var bekanta med kalvarna. Vid de tillfällen två personer utförde provtagningar provtog båda personer kalvar ur båda grupperna. Provtagning hos kontrollkalvarna skedde minst en timme efter schemalagd mjölkgiva.

## 3.4. Databehandling

### 3.4.1. Sårläggning

Sår diameter för höger och vänster hornanlag summerades per genom att genomsnittlig sår diameter beräknades vid för respektive kalv vid varje mättillfälle. De procentuella förändringarna i genomsnittlig sår diameter mellan varje mättillfälle beräknades med följande formel:

$$-\left(1 - \frac{\text{sår diameter vid mättillfället}}{\text{ursprunglig sår diameter}}\right) * 100$$

Tiden för bränning i hela sekunder av höger och vänster hornanlag summerades per kalv genom att genomsnittlig bränntid per hornanlag beräknades.

Bränntidens relation till sårläggning efter avhorning utvärderades grafiskt, för att visualisera sambandet mellan tiden för bränning och procentuell sårläggning vid fyra veckor efter avhorning. Då inget tydligt samband mellan bränntid och sårläggning kunde observeras uteslöts bränntid ur vidare analyser (se Bilaga 1, Figur 8).

## 3.5. Statistiska metoder

### 3.5.1. Sårläggning

För att undersöka ifall skillnad i grad av sårläggning förelåg mellan försöks- och kontrollgruppen fyra veckor efter avhorning utfördes hypotestestning med tvåsidigt Welch's t-test. Signifikansnivån bestämdes *a priori* till  $\alpha = 0,05$ . För att utvärdera om kontrollkalven som avhornades med blomma påverkade resultatet utfördes analysen både med samtliga kalvar inkluderade, och ytterligare en gång där kalven som brändes med blomma uteslöts. Detta eftersom den blombrända kalvens initiala sår diameter skiljde sig markant från medelstorleken hos övriga kalvars sår.

### 3.5.2. Salivkortisol

Hypotestestning utfördes med flera två-sidiga Welch's t-test för att undersöka ifall skillnader mellan gruppernas koncentration av salivkortisol förelåg vid de olika provtagningstillfällena. Då upprepade provtagningar på kalvarna utförts justerades det initiala  $\alpha$ -värdet (0,05) med Bonferroni-korrektion, vilket gav en ny signifikansnivå på  $\alpha = 0,0125$  när salivkortisol analyserades.



## 4. Resultat

### 4.1. Sårhäkning

#### 4.1.1. Deskriptiva resultat

Försökskalvarnas bränntid var i genomsnitt  $14,3 (\pm 2)$  sekunder. Kontrollkalvarnas var i genomsnitt  $13,9 (\pm 3,8s)$  (Figur 4).



Figur 4. Bränntid i sekunder för höger och vänster hornanlag i genomsnitt för försöks- respektive kontrollgrupp.

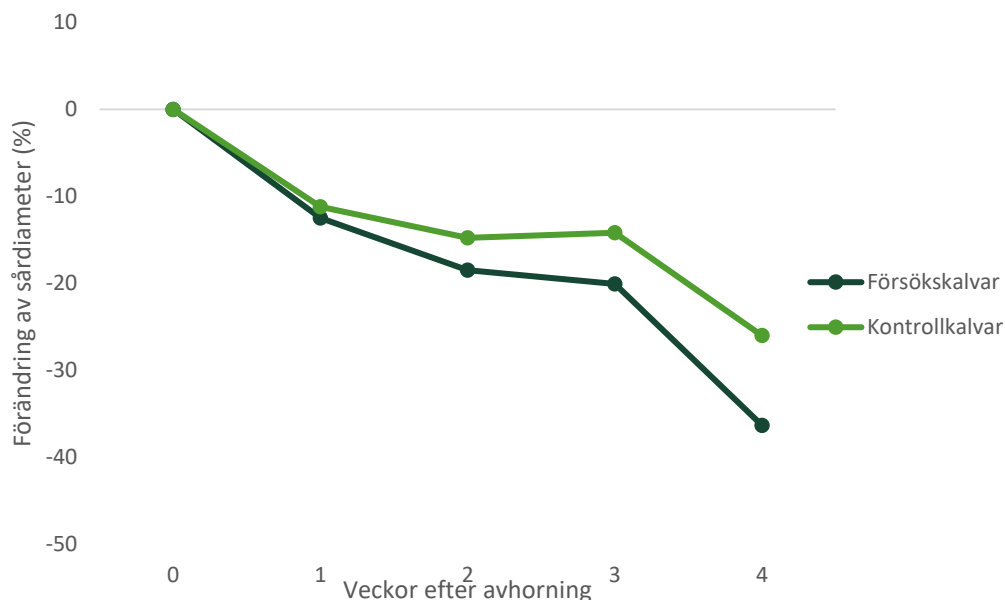
Initial sårstorlek i medeltal försökskalvar var 22,2 mm, och för kontrollkalvar (exklusive blombränd kalv) 22,1 mm. Kalven i kontrollgruppen som brändes med blomma hade en initial sårstorlek på 39 mm, ungefär 76 % större än den genomsnittliga sårstorleken för övriga kalvar.

Efter första veckan hade både försöks- och kontrollgruppen totala sår diameter börjat minska. Reduktionen fortskred under andra veckan efter avhorning för båda grupper (Figur 5).

Vid vecka 2 och 3 hade dock några kalvar i båda grupperna en lika stor eller ökad sårstorlek jämfört med veckan innan. Denna ökning observerades mer frekvent i kontrollgruppen både vecka 2 och 3, vilken även hade fyra kalvar med ökad sårstorlek mellan vecka 3 och 4. (Tabell 2). Enstaka kalvar i kontrollgruppen hade en något ökad sår diameter jämfört med ursprunglig sårstorlek vid vecka 1 ( $n = 1$ , +8,9 %), vecka 2 ( $n = 1$ , +4,7 %) samt vecka 3 ( $n = 2$ , +2,4 % för båda kalvar). Samtliga kalvar i försöksgruppen hade vid varje mättillfälle en mindre sår diameter jämfört med ursprunglig storlek.

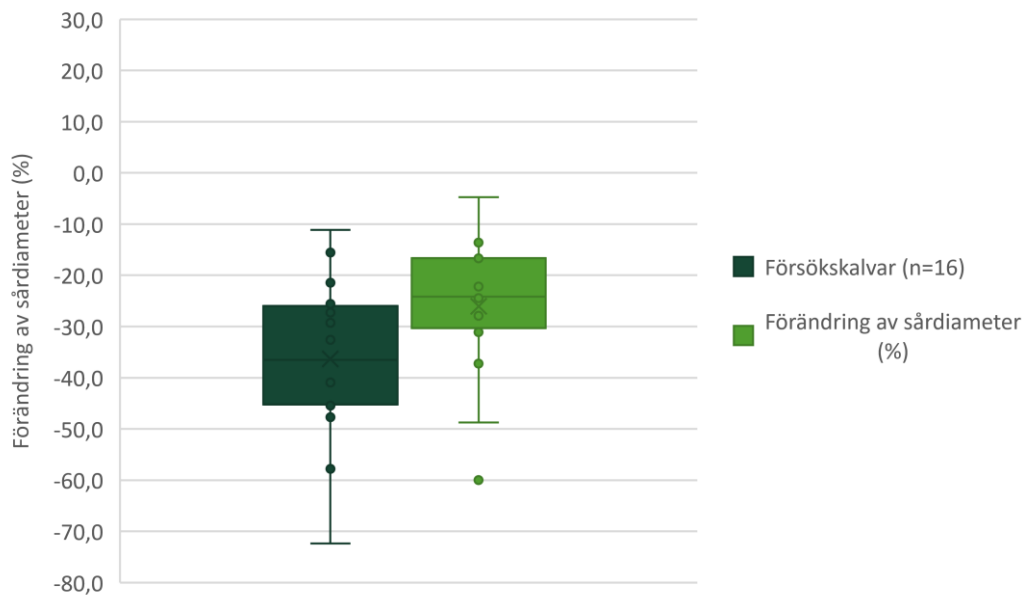
Tabell 2. Antal kalvar i respektive grupp som vid en specifik vecka hade en lika stor eller ökad sår diameter, jämfört med veckan dessförinnan.

Vecka efter avhorning	Försöksgrupp (antal)	Kontrollgrupp (antal)
1	2	1
2	4	6
3	6	9
4	1	3



Figur 5. Procentuell förändring av den genomsnittliga sår diameteren under fyra veckor. Punkterna representerar medelvärdet för samtliga kalvar i försöksgruppen ( $n = 16$ ) och kontrollgruppen ( $n = 16$ ).

Fyra veckor efter avhorning hade försöksgruppens sår i genomsnitt minskat med  $36,4 \% \pm 15,7 \%$  (medelvärde  $\pm$  standardavvikelse) medan kontrollgruppens sår hade minskat med  $27,2\% \pm 13,5 \%$  (Figur 6). Då kalven som brändes med en blomma exkluderades var reduktionen i sårstorlek istället i genomsnitt  $24,5 \% \pm 13,5 \%$  för kontrollgruppen.



Figur 6. Fördelning av kalvarnas totala procentuella förändring av sår diameter fyra veckor efter avhorning.

#### 4.1.2. Hypotestestning

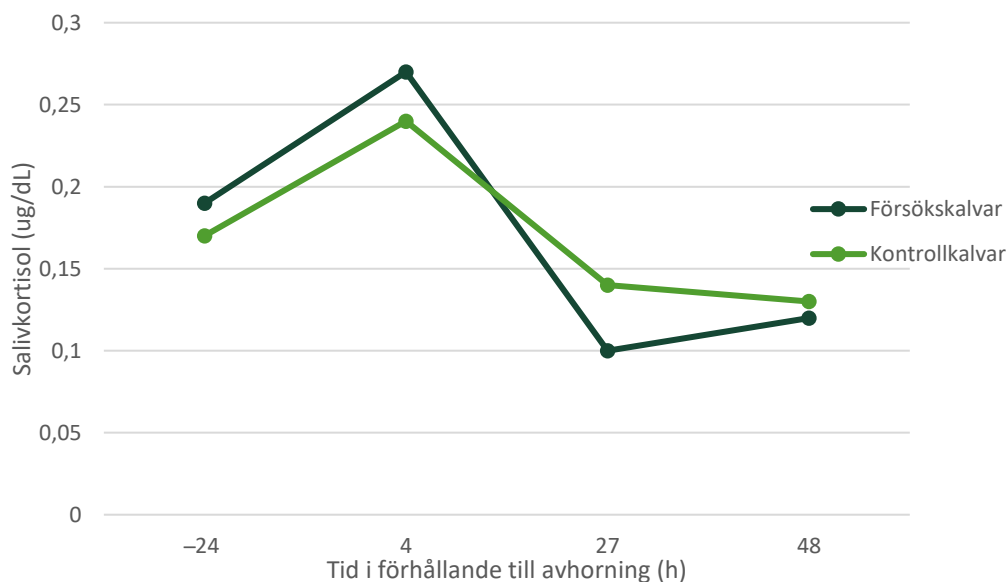
Inga signifikanta skillnader iaktogs för sår läkningen efter fyra veckor mellan grupperna när alla kalvar inkluderades i analysen (försöksgrupp:  $-36,4 \pm 15,7 \%$ ; kontrollgrupp  $-26,0 \pm 13,5 \%$ ;  $t(29) = -1,991$ ;  $P = 0,056$ ).

När kalven som brändes med blomma exkluderades sågs en signifikant skillnad i hur mycket såren hade minskat på fyra veckor mellan grupperna (försöksgrupp:  $-36,4 \pm 15,7 \%$ ; kontrollgrupp  $24,5 \pm 13,5 \%$ ;  $t(28) = -2,326$ ;  $P = 0,0275$ ).

## 4.2. Salivkortisol

### 4.2.1. Deskriptiva resultat

Detekterbara nivåer av kortisol kunde erhållas i samtliga salivprover. Basalnivån för salivkortisol i försöksgruppen var  $0,188 \pm 0,106 \mu\text{g/dL}$ , och för kontrollgruppen  $0,174 \pm 0,061 \mu\text{g/dL}$ . Fyra timmar efter avhorningen hade koncentrationen stigit något i båda grupperna, för att vid 27 timmar ligga under basalnivån. Vid provtagning 48 timmar efter avhorning hade försöksgruppens koncentration i genomsnitt ökat något från det föregående provtagningstillfället, medan kontrollgruppens hade minskat svagt. Båda gruppernas genomsnittliga salivkortisolkoncentration var något lägre än basalnivån vid 27 och 48 timmar efter avhorning (Figur 7).



Figur 7. Genomsnittlig salivkortisolkoncentration för kalvar i försöksgrupp ( $n = 9$ ) respektive kontrollgrupp ( $n = 9$ ). Basalnivå motsvarar provtagning 24h före avhorning.

#### 4.2.2. Hypotestestning

Vid provtagning 24 timmar innan avhorning (basalnivån) förelåg inga signifikanta skillnader i medelvärde för salivkortisolkoncentration mellan grupperna (försöksgrupp:  $0,188 \pm 0,106 \mu\text{g/dL}$ , kontrollgrupp:  $0,174 \pm 0,061 \mu\text{g/dL}$ ;  $t(13) = 0,328$ ;  $P = 0,748$ ). Inte heller vid något av de andra provtagningstillfällena kunde skillnader i koncentrationen av salivkortisol iakttas (Tabell 3).

Tabell 3. Resultat från multipla Welch's t-tester avseende skillnader i koncentration av salivkortisol efter avhorning, mellan försöksgrupp ( $n = 9$ ) och kontrollgrupp ( $n = 9$ ). Signifikansnivån för parvisa tester korrigerad till 0,0125 (Bonferroni-korrigerad för multipla tester).

Tid efter avhorning (h)	Koncentration ( $\mu\text{g/dL}$ ) <sup>*</sup>		t-värde	Fg <sup>**</sup>	P-värde
	Försök	Kontroll			
4	$0,266 \pm 0,143$	$0,236 \pm 0,219$	0,344	14	0,736
27	$0,102 \pm 0,040$	$0,144 \pm 0,072$	-1,531	13	0,150
48	$0,119 \pm 0,098$	$0,132 \pm 0,047$	-0,369	11	0,720

<sup>\*</sup>Medelvärde  $\pm 1$  standardavvikelse. <sup>\*\*</sup>Frihetsgrader.

## 5. Diskussion

### 5.1. Sårhäkning

Studien hade inget specifikt exklusionskriterium avseende sårstorlek, därför utfördes initialt analys med samtliga kalvar inkluderade. Ingen statistik signifikant skillnad i sårhäkning mellan grupperna kunde då identifieras, men en påfallande skillnad iaktogs i de deskriptiva resultaten (försökskalvar:  $-36,4 \pm 15,7$  % sårreducering; kontrollkalvar  $-26 \pm 13,5$  %). Efter övervägande bedömdes det dock olämpligt att inkludera kalvar med en mycket avvikande initial sårstorlek, eftersom detta omöjliggjorde en jämförelse av storleksmässigt standardiserade sår avseende sårhäkning. Kontrollkalven med blombränning hade en initial sår diameter som var närmare 80 % större än resterande kalvars, därför utfördes ytterligare en analys utan denna kalv. Med den blombrända kalven exkluderad observerades en signifikant skillnad i sårhäkning mellan grupperna. Eftersom den senare analysen bedömdes utgöra den mest representativa jämförelsen av sårhäkningen mellan grupperna, lades större vikt vid denna vid tolkning av resultatet. Framtida studier av liknande slag bör med bakgrund av detta överväga att specificera storleksintervall på sår som ska inkluderas i analyserna. Detta kan dock leda till att urvalet av kalvar blir för litet, eftersom sårstorleken avgörs av hornanlagets storlek vilket varierar mellan kalvarna.

De resultat som observeras i vår studie är i linje med de resultat som redovisas i arbetet av Molin Björkdahl (2020). I den studien jämfördes sårhäkningen efter avhorning hos ensamhållna kalvar (kontrollgrupp) med kalvar som var grupphållna med sina mammor (försöksgrupp), och fyra veckor efter avhorning hade såren läkt signifikant mer hos kalvar som hade kontakt med moderdjuren. I Molin Björkdahl (2020) observerades dock en ökning av sår diameter hos både försöks- och kontrollkalvar vid två veckor (och i kontrollgruppen även vid tre veckor) efter avhorning. I vårt försök sågs ingen liknande, tydlig ökning av sårstorlek vid specifika mättillfällen i någon av grupperna. Endast enstaka individers sår i vår studie hade en marginellt större sår diameter från föregående mättillfälle eller ursprunglig sårstorlek upp till tre veckor efter avhorning. Att avhorning skedde vid en tidigare

ålder hos kalvarna i vår studie gjorde att fler sår var av en jämförbar storlek än i Molin Björkdahl (2020).

Den viktigaste skillnaden mellan försöken är troligen att kontrollkalvarna i vår studie hölls tillsammans gruppvis, medan kontrollkalvarna i Molin Björkdahl (2020) hölls i ensambox i samband med avhorningen. Grupphållning har generellt en positiv effekt på sårhäkning hos flocklevande djurarter (Detillion *et al.* 2004; Glasper & DeVries 2005; Pyter *et al.* 2014). Försökskalvarna i vår studie hade en väldigt likartad sårminskning som i arbetet av Molin Björkdahl (2020), men våra grupp-hållna kontrollkalvar läkte i genomsnitt något bättre ( $26,0 \pm 13,5$  %) än ensamkalvarna i arbetet av Molin Björkdahl (2020) ( $10 \pm 12$  %). Att våra försökskalvar dessutom hade en bättre sårhäkning än våra kontrollkalvar, pekar på att kalvens samvaro med kon kan ha en extra positiv inverkan på den tidiga sårhäkningen utöver den sociala gruppens effekt.

Det fanns en stor markant biologisk variation i sårhäkning i båda grupperna. Individuella kalvar med avvikande stor eller liten sårreduktion spelade stor roll för gruppernas genomsnittliga procentuella minskning av sår diameter. Exempelvis fanns i kontrollgruppen en kalv med 60 % sårreduktion, och en kalv i samma grupp vars sår endast minskat med 4,8 %. Potentiella orsakerna till detta har inte undersökts i denna studie. Påverkan på slutresultatet av enskilda individers avvikande data kan dock minskas om fler kalvar inkluderas i framtida studier.

En viktig begränsning med vår studie är att sårhäkningen endast studerades under fyra veckor, inte tills sårerna var helt utläkta. Det går därför inte att uttala sig om huruvida tiden för den slutliga sårhäkningen skiljer sig mellan grupperna. Önskvärt vore att fortsätta följa sårerna en längre tid och se ifall den observerade skillnaden mellan grupperna avseende tidig sårhäkning håller i sig under hela sårhåkningsperioden.

Mätmetoden som användes, att mäta sårens förändring i diameter, valdes för att kunna jämföra resultaten med studien av Molin Björkdahl (2020). Sårerna läkte dock inte symmetriskt, därför skulle mätning av omkretsen ha kunnat ge en mer representativ bild av den faktiska sårreduktionen. Detta skulle dock eventuellt ha inneburit alltför tidskrävande arbetsmoment för denna studie, men kan övervägas i framtida studier.

Vår studiedesign tillät oss inte att kontrollera mjölkintaget för försökskalvarna. Ett större mjölkintag under studieperioden kan ha haft en positiv effekt på försökskalvarnas allmänna immunstatus, vilket i sin tur kan ha varit en av faktorerna som bidrog till den eventuellt större sårreduktionen efter fyra veckor. Det är dock även möjligt att vissa kalvar i försöksgruppen drack mindre mängd mjölk från kon än de skulle ha gjort om de serverades mjölk från napphink; exempelvis kan någon kalv

ha blivit undanskuffad av andra kor och därmed inte fått tillgång till sin mamma i lika stor utsträckning som övriga försökskalvar. Näringstillgången i övrigt var jämförbart då kalvarna i båda grupper hade fri tillgång till både kraft- och grovfoder.

Vid avhorning gjordes på enstaka kalvar i båda grupper små avvikningar från tidsprotokollet på grund av olika praktiska omständigheter. Det handlade främst om att vänta upp till två minuter längre innan bränning efter lokalbedövning eftersom brännjärnet ibland var otillräckligt upphettat vid korrekt tidpunkt. Samma fenomen förekom dock i både försöks- och kontrollgruppen på ett jämförbart antal kalvar.

Att kalvarna var vakna vid de flesta mättillfällena tillför en osäkerhet i mätvärdena. Även detta gällde dock samtliga försöks- och kontrollkalvar, därför blir denna felkälla lika stor för båda grupperna.

## 5.2. Salivkortisol

Studien kunde inte fastslå skillnader mellan grupperna i koncentration av salivkortisol vid någon tidpunkt efter avhorning, vilket motsäger den initiala hypotesen för studien. Förändringarna i koncentrationen under de första två dygnen efter avhorning var likartade i båda grupper. Den koncentrationstopp som observerades i båda grupperna fyra timmar efter avhorning tolkas som en reaktion på stress i samband med hanteringen vid avhorningen (Boandl *et al.* 1989), samt troligen viss smärta då effekten av lokalbedövningen avtagit vid den tidpunkten (Graf & Senn 1999).

Vad gäller saliv som metod för att mäta kortisol hos kalvar noterades vissa utmaningar. För att inte få blod med i provet var en varsam provtagning helt avgörande, vilket försvårades av vissa kalvars tendens till att slänga med huvudet eller på annat sätt försöka undkomma provtagning. Då båda grupperna hade fri tillgång till kraft- och grovfoder, kunde inte heller provtillverkarens rekommendationer om minst en timme mellan foderkonsumtion och provtagning med säkerhet följas. Enligt Schwinn *et al.* (2016) ska dock varken intag av foder eller vatten innan provtagning påverka salivkortisolvärdena. Att eliminera fodret innan provtagning var i detta försök inte möjligt av praktiska skäl, och skulle inte nödvändigtvis lösa problemet eftersom idissling fortfarande kunde ske. Foderpartiklar i salivproverna observerades ibland i prover från båda grupper, vilket kan ha påverkat kortisolkoncentrationerna. Det fanns dock inga systematiska skillnader mellan grupperna för ovan nämnda faktorer.

I möjligaste mån undveks fasthållning vid provtagning, men var i vissa fall nödvändigt vilket kan ha gett ett högre stresspåslag. Enstaka av försökskalvarna föreföll något mer stressade vid provtagning än kontrollkalvarna, vilket kan ha berott på att



de senare var mer vana vid människor då de fick mjölk i spenhink tre gånger per dag. Provtagningen tog dock aldrig mer än fem minuter per kalv, vilket gör att en eventuell salivkortisoltopp inte bör hunnit inträffa eftersom förändringar i salivkortisol har en fördröjning på 10 minuter relativt plasmakortisol (Hernandez *et al.* 2014). Framtida studier skulle dock med fördel kunna utformas på ett sätt där kalvarna har ungefär lika mycket mänsklig kontakt en viss period innan provtagning utförs.

Avhorningarna påbörjades vid samma tidpunkt varje gång för att utesluta effekter från en eventuell diurnal variation av kortisolfrisättningen. Vid avhorning uppstod enstaka mindre avvikelser från protokollet med bestämda tider mellan momenten (främst mellan lokalbedövning och bränning), eftersom brännjärnet vid dessa tillfällen inte bedömdes vara tillräckligt varmt. Lidokain har en snabb verknings effekt som resulterar i smärtlöshet inom < 1–15 minuter, vilken kvarstår i uppåt två timmar efter injektion (FASS Djurläkemedel 2020). Bränning påbörjades hos samtliga kalvar tidigast 10 minuter efter att lokalbedövning injicerats, och de djur där bränningen påbörjades något senare (0,5–2 minuter) skiljde sig inte från resterande kalvar avseende reaktion eller beteende vid avhorning. Givet detta bedömdes att ingen av kalvarna var otillräckligt lokalbedövade. Att dessa mindre tidsavvikelser skulle ha påverkat kortisolnivåerna på grund av varierande duration av lokalbedövningen efter ingreppet bedöms därför som osannolikt. I våra insamlade data ses heller inga avvikande värden hos kalvar med mindre avvikelser i protokollet som skulle tala emot denna bedömning.

Det är tänkbart att olika bränntider vid avhorning potentiellt skulle kunna ge skillnader i postoperativa kortisolnivåer. I vår studie varierade bränntiden från 10–17 sekunder per hornanlag för de kalvar som provtogs för salivkortisol. I studien av Wohlt *et al.* (1994) observerades dock ingen skillnad på plasmakortisolnivåerna hos kalvar när brännjärnet låg an 1–2 minuter jämfört med om brännjärnet låg an i 10 sekunder. Vid avhorning med kortare bränntid var brännjärnet dock varmare (816 °C jämfört med 538 °C) vilket kan ha spelat roll för studiens resultat. Resultaten ger inte desto mindre en indikation om att kortisolnivåerna postoperativt är likartade vid olika bränntid, möjligen på grund av att smärtupplevelsen inte påverkas speciellt mycket av bränntiden.

Samtliga tjurkalvar som provtogs för salivkortisol kastrerades vid avhorning, vilket innebar ett större operativt ingrepp och därmed större stress för kroppen och immunförsvaret. Detta utgjorde potentiellt en könsbias för kortisolvärdena i studien. Då könsfördelningen var likadan mellan grupperna var detta dock inte en faktor som systematiskt påverkade kortisolnivåerna olika i de båda grupperna.

Vissa mindre avvikelser i protokollet för provtagningstidpunkter gjordes. Den först avhornade kalven i försöksgruppen provtogs 26 timmar efter avhorning eftersom detta var den initialt valda provtagningstiden. Då utfodringsschemat ändrades och krockade med provtagningen ändrades denna provtagning till 27 timmar efter avhorning för resterande kalvar. En av kalvarna i försöksgruppen noterades dia när provtagning egentligen skulle ske, detta prov togs därför en timme senare för att undvika falskt höga kortisolvärden.

### 5.3. Potentiella faktorerers påverkan på sår läkningen

Kortisol är en faktor som i tidigare studier lyfts som en potentiell faktor i sår läkningen (Detillion *et al.* 2004; Stephens *et al.* 1971). En analys av ett eventuellt samband mellan salivkortisolnivåer och sår läkning fyra veckor efter avhorning gjordes dock inte i denna studie. Antalet kalvar som provtogs för kortisol bedömdes vara för få för att en sådan sambandsanalys skulle ge ett tillförlitligt resultat. Tidigare studier har påvisat ett samband mellan låga kortisolnivåer och en förbättrad sår läkning (Detillion *et al.* 2004). Det finns dock indirekta indikationer på att kortisolet i denna studie inte utgjorde en avgörande faktor för sår läkningen. Detta då kortisolkurvan var likartad för båda grupperna, samtidigt som en skillnad i medelvärde för den tidiga sår läkningen förelåg. Den mindre sårreduktionen hos kontrollkalvarna verkar ha orsakats av andra anledningar än att ett högt kortiselpåslag hämmat sår läkningen. Detta talar för att något i den sociala kontakten med mamman kan ha påverkat sår läkningen positivt hos försökskalvarna. Viss försiktighet bör dock tas i anspråk avseende denna tolkning, och uppföljande studier behövs för att ge mer stöd åt slutsatsen.

En annan potentiell faktor som kan ha haft effekt på sår läkningen är hormonet oxytocin. Diande kalvar har högre nivåer av oxytocin än kalvar som utfodras ur hink (Lupoli *et al.* 2001). Oxytocin har i ett antal studier framhållits som en substans som stimulerar sår läkningen på gnagare (hamster, Detillion *et al.* 2004; möss, Poutahidis *et al.* 2013), inklusive läkning av brännsår (råttor, Vitalo *et al.* 2009). I studien av Detillion *et al.* (2004) framhålls främst hormonets kortisolkämmande roll som en orsak till stimulerad sår läkning, men det finns studier som breddar bilden av oxytocinets potentiella effekt. En humanstudie av Clodi *et al.* (2008) fann att administration av exogent oxytocin hämmade det inflammatoriska svaret efter stimulering av ett endotoxin (LPS). Överdriven inflammation är negativt för sår läkning (Menke *et al.* 2007), och en potentiell reglering av inflammationen via oxytocin kan därmed tänkas stimulera en sårreduktion. I Poutahidis *et al.* (2013) observerades en förbättrad sår läkning hos möss som konsumerat bakterien *Lactobacillus reuteri*, men effekten var helt avhängig närvaron av oxytocin. Receptorer för oxytocin har identifierats i thymus hos möss (Elands *et al.* 1990) och hormonet

inverkar på sekretionen av thymushormoner (Barnard *et al.* 2008), vilket innebär en potentiell effekt på immunreglerande mekanismer.

## 5.4. Slutsatser

Avseende sår av jämförbar initial storlek, var den tidiga sårreduktionen efter avhorning var större hos gruppållna kalvar som hölls tillsammans med sin mamma. Eftersom detta inte kunde förklaras av skillnader i kortisol mellan grupperna, kan det ha funnits något annat i den sociala kontakten med kon som stimulerade sårläggningen. Med bakgrund av resultaten vore det önskvärt med uppföljande studier av större studiestorlek, som även undersöker oxytocin som en potentiellt bidragande faktor i sårläggningen.

# Referenser

- Allen, M.J. & Sharma, S. (2020). *Physiology, Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH)*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing
- Anderson, D.E. & Muir, W.W. (2005). Pain Management in Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, vol. 21 (3). 623–635.  
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2005.07.002>
- Archie, E.A., Altmann, J. & Alberts, S.C. (2012). Social Status Predicts Wound Healing in Wild Baboons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109 (23). 9017-9022. DOI: 10.1073/pnas.1206391109 <https://doi.org/10.1073/pnas.1206391109>
- Barnard, A., Layton, D., Hince, M., Sakkal, S., Bernard, C., Chidgey, A. & Boyd, R. (2008). Impact of the Neuroendocrine System on Thymus and Bone Marrow Function. *Neuroimmunomodulation*, vol. 15 (1). 7–18. <https://doi.org/10.1159/000135619>
- Boandl, K.E., Wohlt, J.E. & Carsia, R.V. (1989). Effects of Handling, Administration of a Local Anesthetic, and Electrical Dehorning on Plasma Cortisol in Holstein Calves. *Journal of Dairy Science*, vol. 72 (8). 2193–2197. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79345-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79345-0)
- Chan, S. & Debono, M. (2010). Replication of Cortisol Circadian Rhythm: New Advances in Hydrocortisone Replacement Therapy. *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, vol. 1 (3). 129–138.  
<https://doi.org/10.1177/2042018810380214>
- Clodi, M., Vila, G., Geyeregger, R., Riedl, M., Stulnig, T.M., Struck, J., Luger, T.A. & Luger, A. (2008). Oxytocin Alleviates the Neuroendocrine and Cytokine Response to Bacterial Endotoxin in Healthy Men. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 295 (3). E686–E691. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90263.2008>
- Detillion, C.E., Craft, T.K.S., Glasper, E.R., Prendergast, B.J. & DeVries, A.C. (2004). Social Facilitation of Wound Healing. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 29 (8). 1004–1011. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2003.10.003>
- Ditzen, B., Neumann, I.D., Bodenmann, G., von Dawans, B., Turner, R.A., Ehlert, U. & Heinrichs, M. (2007). Effects of Different Kinds of Couple Interaction on Cortisol and Heart Rate Responses to Stress in Women. *Psychoneuroendocrinology*, vol. 32 (5). 565–574. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.03.011>
- Ditzen, B., Schmidt, S., Strauss, B., Nater, U.M., Ehlert, U. & Heinrichs, M. (2008). Adult Attachment and Social Support Interact to Reduce Psychological But Not Cortisol Responses to Stress. *Journal of Psychosomatic Research*, vol. 64 (5). 479–486.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2007.11.011>
- Doherty, T.J., Kattesh, H.G., Adcock, R.J., Welborn, M.G., Saxton, A.M., Morrow, J.L. & Dailey, J.W. (2007). Effects of a Concentrated Lidocaine Solution on the Acute

- Phase Stress Response to Dehorning in Dairy Calves. *Journal of Dairy Science*, vol. 90 (9). 4232–4239. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0080>
- Elands, J., Resink, A., De Kloet, E.R. (1990). Neurohypophyseal Hormone Receptors in the Rat Thymus, Spleen, and Lymphocytes. *Endocrinology*, vol. 126 (5). 2703–2710. <https://doi.org/10.1210/endo-126-5-2703>
- FASS Djurläkemedel (2018). *Lidor vet*. <https://www.fass.se/LIF/product?userType=1&nplId=20170223000027> [2021-02-14]
- FASS Djurläkemedel (2020). *Metacam® för nötkreatur, svin och häst*. <https://www.fass.se/LIF/product?userType=1&nplId=20010423000031> [2021-02-14]
- Faulkner, P.M. & Weary, D. (2000). Reducing Pain After Dehorning in Dairy Calves. *Journal of Dairy Science*, vol. 83. 2037–41. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75084-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75084-3)
- Gesquiere, L., Learn, N., Simao, M.-C., Onyango, P., Alberts, S. & Altmann, J. (2011). Life at the Top: Rank and Stress in Wild Male Baboons. *Science (New York, N.Y.)*, vol. 333. 357–60. <https://doi.org/10.1126/science.1207120>
- Glasper, E.R. & DeVries, A.C. (2005). Social Structure Influences Effects of Pair-Housing on Wound Healing. *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 19 (1). 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2004.03.002>
- Gouin, J.-P. & Kiecolt-Glaser, J.K. (2011). The Impact of Psychological Stress on Wound Healing: Methods and Mechanisms. *Immunology and Allergy Clinics*, vol. 31 (1). 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2010.09.010>
- Graf, B. & Senn, M. (1999). Behavioural and Physiological Responses of Calves to Dehorning by Heat Cauterization With or Without Local Anaesthesia. *Applied Animal Behaviour Science*, vol. 62 (2). 153–171. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(98\)00218-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(98)00218-4)
- Heinrich, A., Duffield, T.F., Lissemore, K.D., Squires, E.J. & Millman, S.T. (2009). The Impact of Meloxicam on Postsurgical Stress Associated With Cautery Dehorning. *Journal of Dairy Science*, vol. 92 (2). 540–547. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1424>
- Hernandez, C.E., Thierfelder, T., Svennersten-Sjaunja, K., Berg, C., Orihuela, A. & Lidfors, L. (2014). Time Lag Between Peak Concentrations of Plasma and Salivary Cortisol Following a Stressful Procedure in Dairy Cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 56 (1). <https://doi.org/10.1186/s13028-014-0061-3>
- Junger, H., Moore, A.C. & Sorkin, L.S. (2002). Effects of Full-Thickness Burns on Nociceptor Sensitization in Anesthetized Rats. *Burns*, vol. 28 (8). 772–777. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(02\)00199-7](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(02)00199-7)
- Ladewig, J. & Smidt, D. (1989). Behavior, Episodic Secretion of Cortisol, and Adrenocortical Reactivity in Bulls Subjected to Tethering. *Hormones and Behavior*, vol. 23 (3). 344–360. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(89\)90048-2](https://doi.org/10.1016/0018-506X(89)90048-2)
- Latarjet, J. & Choinère, M. (1995). Pain in Burn Patients. *Burns*, vol. 21 (5). 344–348. [https://doi.org/10.1016/0305-4179\(95\)00003-8](https://doi.org/10.1016/0305-4179(95)00003-8)
- Lefcourt, A.M., Bitman, J., Kahl, S. & Wood, D.L. (1993). Circadian and Ultradian Rhythms of Peripheral Cortisol Concentrations in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, vol. 76 (9). 2607–2612. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77595-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77595-5)
- Li, J., Chen, J. & Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of Acute Wound Healing. *Clinics in Dermatology*, vol. 25 (1). 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.09.007>

- Lupoli, B., Johansson, B., Uvnäs-Moberg, K. & Svennersten-Sjaunja, K. (2001). Effect of Suckling on the Release of Oxytocin, Prolactin, Cortisol, Gastrin, Cholecystokinin, Somatostatin and Insulin in Dairy Cows and Their Calves. *The Journal of Dairy Research*, vol. 68 (2). 175–187. <https://doi.org/10.1017/S0022029901004721>
- Menke, N.B., Ward, K.R., Witten, T.M., Bonchev, D.G. & Diegelmann, R.F. (2007). Impaired Wound Healing. *Clinics in Dermatology*, vol. 25 (1). 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.12.005>
- Metz, J. (1987). Productivity Aspects of Keeping Dairy Cow and Calf Together in the Post-partum Period. *Livestock Production Science*, vol. 16 (4). 385–394. [https://doi.org/10.1016/0301-6226\(87\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0301-6226(87)90007-8)
- Moolchandani, A., Sareen, M. & Vaishnav, J. (2008). Influence of Restraint and Isolation Stress on Plasma Cortisol in Male Karakul Sheep. *Veterinarski Arhiv*, vol. 78 (4). 357–362. URI: <https://hrcak.srce.hr/26542>
- Morisse, J.P., Cotte, J.P. & Huonnic, D. (1995). Effect of Dehorning on Behaviour and Plasma Cortisol Responses in Young Calves. *Applied Animal Behaviour Science*, vol. 43 (4). 239–247. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(95\)00569-E](https://doi.org/10.1016/0168-1591(95)00569-E)
- Munksgaard, L. & Simonsen, H.B. (1996). Behavioral and Pituitary Adrenal-Axis Responses of Dairy Cows to Social Isolation and Deprivation of Lying Down. *Journal of Animal Science*, vol. 74 (4). 769–778. <https://doi.org/10.2527/1996.744769x>
- Negrão, J.A., Porcionato, M.A., de Passillé, A.M. & Rushen, J. (2004). Cortisol in Saliva and Plasma of Cattle After ACTH Administration and Milking. *Journal of Dairy Science*, vol. 87 (6). 1713–1718. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73324-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73324-X)
- Nilsson, M. (2019). *Mjölkkor*. 3:e uppl., Tyskland: Norderstedt.
- Poutahidis, T., Kearney, S.M., Levkovich, T., Qi, P., Varian, B.J., Lakritz, J.R., Ibrahim, Y.M., Chatzigiagkos, A., Alm, E.J. & Erdman, S.E. (2013). Microbial Symbionts Accelerate Wound Healing via the Neuropeptide Hormone Oxytocin. *PLOS ONE*, vol. 8 (e78898). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078898>
- Pyter, L.M., Yang, L., da Rocha, J.M. & Engeland, C.G. (2014). The Effects of Social Isolation on Wound Healing Mechanisms in Female Mice. *Physiology & Behavior*, vol. 127. 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.01.008>
- Rousselle, P., Montmasson, M. & Garnier, C. (2019). Extracellular Matrix Contribution to Skin Wound Re-epithelialization. *Matrix Biology*, vol. 75–76. 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.01.002>
- Rowan, M.P., Cancio, L.C., Elster, E.A., Burmeister, D.M., Rose, L.F., Natesan, S., Chan, R.K., Christy, R.J. & Chung, K.K. (2015). Burn Wound Healing and Treatment: Review and Advancements. *Critical Care*, vol. 19 (1). <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0961-2>
- Schwinn, A.-C., Knight, C.H., Bruckmaier, R.M. & Gross, J.J. (2016). Suitability of Saliva Cortisol as a Biomarker for Hypothalamic-pituitary-adrenal Axis Activation Assessment, Effects of Feeding Actions, and Immunostimulatory Challenges in Dairy Cows. *Journal of Animal Science*, vol. 94 (6). 2357–2365. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-0260>
- Singer, A.J. & Clark, R.A.F. (1999). Cutaneous Wound Healing. *New England Journal of Medicine*, vol. 341 (10). 738–746. <https://doi.org/10.1056/NEJM199909023411006>

- Singer, A.J., McClain, S.A., Taira, B.R., Guerriero, J.L. & Zong, W. (2008). Apoptosis and Necrosis in the Ischemic Zone Adjacent to Third Degree Burns. *Academic Emergency Medicine*, vol. 15 (6). 549–554. <https://doi.org/10.1111/j.1553-2712.2008.00115.x>
- Spencer, R.L. & Deak, T. (2017). A Users Guide to HPA Axis Research. *Physiology & Behavior*, vol. 178. 43–65. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.11.014>
- Stechmiller, J.K. (2010). Understanding the Role of Nutrition and Wound Healing. *Nutrition in Clinical Practice*, vol. 25 (1). 61–68. <https://doi.org/10.1177/0884533609358997>
- Stephens, F.O., Dunphy, J.E. & Hunt, T.K. (1971). Effect of Delayed Administration of Corticosteroids on Wound Contraction. *Annals of Surgery*, vol. 173 (2). 214–218. <https://doi.org/10.1097/00000658-197102000-00005>
- Stilwell, G., Lima, M.S., Carvalho, R.C. & Broom, D.M. (2012). Effects of Hot-iron Disbudding, Using Regional Anaesthesia With and Without Carprofen, on Cortisol and Behaviour of Calves. *Research in Veterinary Science*, vol. 92 (2). 338–341. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.02.005>
- Stott, G.H., Marx, D.B., Menefee, B.E. & Nightengale, G.T. (1979). Colostral Immunoglobulin Transfer in Calves. IV. Effect of Suckling. *Journal of Dairy Science*, vol. 62 (12). 1908–1913. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(79\)83522-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83522-5)
- Thun, R., Eggenberger, E., Zerobin, K., Lüscher, T. & Vetter, W. (1981). Twenty-Four-Hour Secretory Pattern of Cortisol in the Bull: Evidence of Episodic Secretion and Circadian Rhythm. *Endocrinology*, vol. 109 (6). 2208–2212. <https://doi.org/10.1210/endo-109-6-2208>
- Uruakpa, F.O., Ismond, M.A.H. & Akobundu, E.N.T. (2002). Colostrum And Its Benefits: a review. *Nutrition Research*, vol. 22 (6). 755–767. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(02\)00373-1](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(02)00373-1)
- Vitalo, A., Fricchione, J., Casali, M., Berdichevsky, Y., Hoge, E.A., Rauch, S.L., Berthiaume, F., Yarmush, M.L., Benson, H., Fricchione, G.L. & Levine, J.B. (2009). Nest Making and Oxytocin Comparably Promote Wound Healing in Isolation Reared Rats. *PLOS ONE*, vol. 4 (e5523). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005523>
- Vittner, D., McGrath, J., Robinson, J., Lawhon, G., Cusson, R., Eisenfeld, L., Walsh, S., Young, E. & Cong, X. (2018). Increase in Oxytocin From Skin-to-Skin Contact Enhances Development of Parent-Infant Relationship. *Biological Research for Nursing*, vol. 20 (1). 54–62. <https://doi.org/10.1177/1099800417735633>
- Wagner, K., Seitner, D., Barth, K., Palme, R., Futschik, A. & Waiblinger, S. (2015). Effects of Mother versus Artificial Rearing During The First 12 Weeks of Life on Challenge Responses of Dairy Cows. *Applied Animal Behaviour Science*, vol. 164. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.12.010>
- Wikman, I., Hokkanen, A.-H., Pastell, M., Kauppinen, T., Valros, A. & Hänninen, L. (2013). Dairy Producer Attitudes to Pain in Cattle In Relation To Disbudding Calves. *Journal of Dairy Science*, vol. 96 (11). 6894–6903. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6128>
- Wohlt, J.E., Allyn, M.E., Zajac, P.K. & Katz, L.S. (1994). Cortisol Increases in Plasma of Holstein Heifer Calves, from Handling and Method of Electrical Dehorning. *Journal of Dairy Science*, vol. 77 (12). 3725–3729. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77317-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77317-3)



# Populärvetenskaplig sammanfattning

Mjölkkor och deras kalvar brukar normalt sett separeras från varandra inom det kalvens första levnadsdygn. I dagsläget pågår ett projekt där en rad olika faktorer hos undersöks hos kalvar som istället får växa upp tillsammans med sina mammor. I denna studie undersökte vi om sår läkningen efter avhorning skiljde sig mellan kalvarna som gick i grupp med respektive utan sina mammor. Ett tidigare examensarbete av Molin Björkdahl (2020) har undersökt en liknande frågeställning, men då istället jämfört en ko-kalvgrupp med kalvar som hölls i ensamboxar. Resultat från den studien pekade på att kalvar i social grupp med sin mamma hade en större sårminskning än ensamkalvarna fyra veckor efter avhorning. I vår uppföljande studie ville vi börja undersöka något som kan ha bidragit till detta.

I det tidigare examensarbetet föreslogs kortisol kunna vara en sådan faktor. Kortisol är ett hormon som stiger vid bland annat smärta och stress, och höga nivåer kortisol i blodet har i litteraturen beskrivits kunna ge bidra till försämrad sår läkning på gnagare. Därför valdes vissa kalvar ut för provtagning av salivkortisol, och kortisolnivåerna vid olika tillfällen jämfördes mellan grupperna. Att ta salivprover är en enklare och mindre stressande metod än att ta blodprover, och halterna av kortisol i saliv har visats stämma väl överens med halterna av kortisol i blod.

## **Hur utförde vi studien?**

Mjölkkalvar födda på Lövsta Forskningscentrum under hösten 2020 fördelades i en försöksgrupp och en kontrollgrupp. Avhorningar utfördes när kalvarna var mellan 14 och 20 dagar gamla. Sårens diameter mättes med ett skjutmått direkt efter avhorningen och därefter var sjunde dag i fyra veckor. Sammanlagt hade vi 16 kalvar i vardera grupper när sår läkningen analyserades.

För provtagning av salivkortisol valdes nio kalvar ut i vardera grupper. Provtagningen utfördes genom att en bomullspinne fördes in i munnen i ungefär två minuter. Efter provtagning förvarades proverna fryst innan de analyserades. Första salivprovet togs 24 timmar innan avhorning för att få ett basalvärde för salivkortisol. Därefter togs prover 4, 27 och 48 timmar efter avhorning. Analyseringen utfördes inom två månader med en ELISA-metod av KV Lab på Sveriges Lantbruksuniversitet.

### **Vad blev våra resultat och slutsatser?**

Vi såg i våra grafer att försökskalvarnas sår i genomsnitt hade minskat iögonfallande mycket (ungefär 36 %) jämfört med kontrollkalvarnas (ungefär 26 %). Om man jämför våra resultat med tidigare liknande examensarbete, kan se att våra kontrollkalvar i grupp läkte bättre än kalvarna i Molin Björkdahl (2020) som hölls i ensamboxar (dessa läkte ungefär 10 %). Att hålla kalvarna i grupp tillsammans verkar alltså överlag vara positivt för sår läkningen, och enligt vår studie blev den ännu bättre när ko och kalv hålls tillsammans.

I studien ville vi som tidigare nämnt undersöka ifall det finns något som talade för att kortisol kan kopplas till sår läkningen hos kalvarna. I vår studie hade vi tyvärr inte tillräckligt många kalvar i kortisolstudien för att göra en bra statistisk analys av sambandet mellan kortisol och sår läkning. Vi upptäckte däremot att det varken fanns någon statistisk skillnad eller någon tydlig skillnad i graferna mellan gruppernas kortisolvärde. Istället såg diagrammen väldigt likartade ut för båda grupper vid alla provtagningstillfällen. Detta bedömdes som en indirekt indikation på att det inte var skillnader i kortisol som gjorde att kontrollkalvarnas sår inte läkte riktigt lika bra som försökskalvarnas. Det skulle därför kunna finnas något annat i kontakten mellan ko och kalv som skiljer sig från kalvar som hålls i grupp utan sin mamma.

### **Vad resultaten kan användas till?**

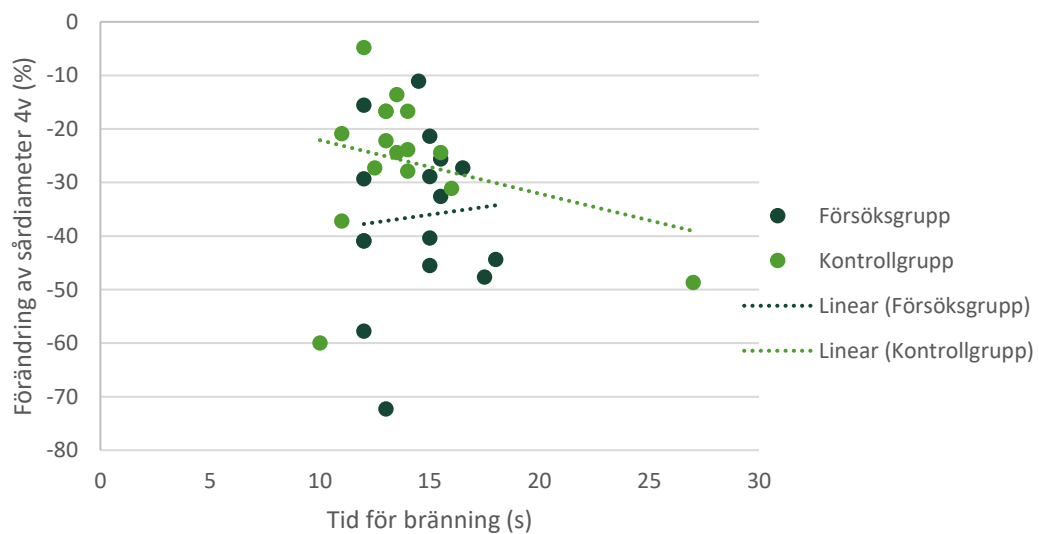
En snabbare sår läkning kan betyda en bättre generell djurhälsa och djurvälstånd, vilket ger mer incitament till att låta kalvar hållas tillsammans sina mammor. Framtida studier kan med fördel följa upp denna studie, gärna då med fler kalvar i varje grupp, och undersöka andra faktorer som kan påverka sår läkningen.

Något som förts fram i litteraturen är att hormonet oxytocin kan ha en roll i detta. Bland annat är nivåerna av hormonet högre hos kalvar som får dia från sin mamma jämfört med kalvar som dricker mjölk ur hink. Det finns också vissa studier som menar att oxytocin påverkar immunförsvaret, och immunförsvaret påverkar i sin tur sår läkningen. Det vore därför intressant med en studie som undersöker nivåerna av oxytocin hos olika grupper av kalvar i samband med avhorning.

# Bilagor

## Bilaga 1

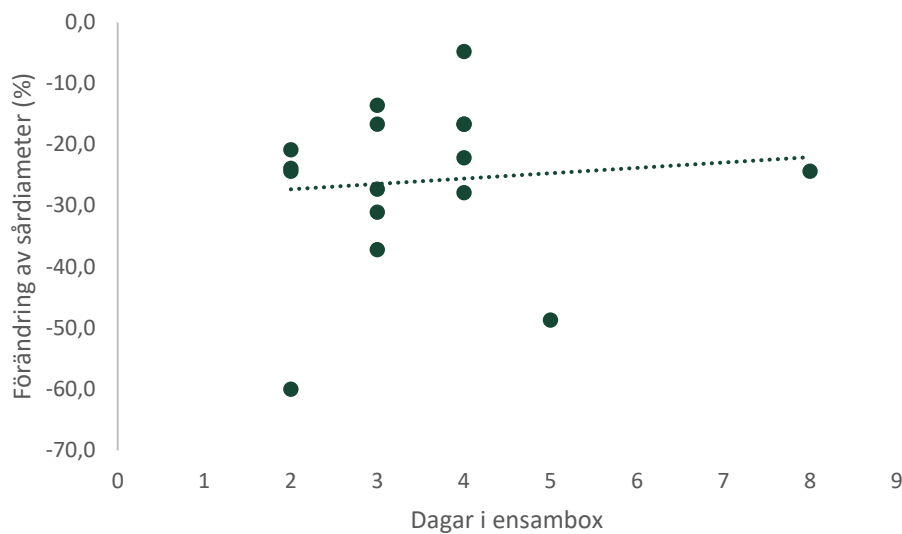
Tiden för bränning av höger respektive vänster hornanlag slogs samman för varje kalv, och ett medelvärde beräknades. Samtliga kalvars medelvärde plottades i ett diagram för att visualisera eventuella samband mellan bränntid och förändring i sårdiameter fyra veckor efter avhorning. Ingen tydlig korrelation mellan dessa faktorer kunde observeras i någon av grupperna (Figur 8).



Figur 8. Bränntid i förhållande till sårsläkning fyra veckor efter avhorning hos försöksgrupp ( $n = 16$ ) respektive kontrollgrupp ( $n = 16$ ). Punkterna representerar individuella kalvars procentuella sårförändring.

## Bilaga 2

Kontrollkalvarna hölls olika antal dagar i ensamboxar innan förflyttning till gruppboxarna. Detta då ingen kalv fick vistas ensam i gruppboxarna, och enstaka kalvar därför fick invänta att ännu en kalv föddes innan förflyttning. För att undersöka ett eventuellt samband mellan antal dagar i ensambox och långsammare sårhäkning plottades denna data i ett punktdiagram. Vid visuell bedömning av diagrammet observerades inget tydligt samband mellan antal dagar i ensambox och sårhäkning fyra veckor efter avhorning (Figur 9).



*Figur 9. Sårhäkning hos kontrollkalvar (n=16) fyra veckor efter avhorning i förhållande till antal dagar i ensambox. Punkterna motsvarar varje kontrollkalvs procentuella förändring i sårdiameter.*